

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-110722

(43) 公開日 平成9年(1997)4月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 45/00 9/127 31/16 31/70	ADU		A 6 1 K 45/00 9/127 31/16 31/70	ADU L Z
審査請求 未請求 請求項の数9 F D (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-295918	(71) 出願人	000003159 東レ株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
(22) 出願日	平成7年(1995)10月20日	(72) 発明者	吉田 純 愛知県名古屋市東区筒井1-4-10
		(72) 発明者	小林 猛 愛知県名古屋市千種区下方町4-29
		(72) 発明者	萩原 正敏 愛知県名古屋市東区矢田2-66
		(72) 発明者	水野 正明 愛知県知多郡東浦町大字緒川字濁池西25-8
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗腫瘍活性物質の腫瘍細胞内導入用イムノリボソーム及びその調製法

(57) 【要約】

【解決手段】 セラミド、抗Fas抗体、マグネタイト及び遺伝子から成る群より選ばれる抗腫瘍活性物質を腫瘍細胞に選択的に反応するモノクローナル抗体(抗CD44抗体)を結合させたカチオン性リボソームに封入又は包埋したことを特徴とするイムノリボソームならびにその調製方法。

【効果】 本発明のイムノリボソームによれば、抗腫瘍活性物質を効率よくかつ選択的に導入してアポトーシスを誘導したり、温熱又は遺伝子治療のベクターとして働きうるので、悪性腫瘍に対する治療に効果的である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗腫瘍活性物質を含むカチオン性リボソーム膜に、腫瘍細胞に選択的に反応するモノクローナル抗体G-22（抗CD44抗体）を結合させたことを特徴とするイムノリボソーム。

【請求項2】 抗腫瘍活性物質が、セラミド、抗Fas抗体、マグネタイト、及び遺伝子から成る群から選ばれたものである、請求項1記載のイムノリボソーム。

【請求項3】 遺伝子が、自殺遺伝子又はサイトカイン遺伝子である請求項2記載のイムノリボソーム。

【請求項4】 サイトカインが、インターフェロン(IFN)- α 、 β 、 γ 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン(IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、腫瘍壊死因子(TNF)- α 、リンボキシン(LT)- β 、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)、白血病抑制因子(LIF)、T細胞活性化共刺激因子B7(CD80)及びB7-2(CD86)、キッド・リガンド、オンコスタチンMから成る群から選ばれたものである、請求項3記載のイムノリボソーム。

【請求項5】 カチオン性リボソーム膜を構成する脂質が、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDAB)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)を含む請求項1記載のイムノリボソーム。

【請求項6】 腫瘍細胞が、CD44過剰発現細胞である請求項1記載のイムノリボソーム。

【請求項7】 CD44過剰発現細胞が、グリオーマ細胞、メラノーマ細胞、肺癌細胞である請求項6記載のイムノリボソーム。

【請求項8】 抗腫瘍活性物質を含むカチオン性リボソーム膜に、腫瘍細胞に選択的に反応するモノクローナル抗体G-22（抗CD44抗体）を添加し、混合し、振盪することを特徴とするイムノリボソームの調製方法。

【請求項9】 抗腫瘍活性物質が、セラミド、抗Fas抗体、マグネタイト、及び遺伝子から成る群から選ばれたものである、請求項8記載のイムノリボソームの調製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、腫瘍細胞にセラミド又は抗Fas抗体を選択的に導入してアポトーシスを効率良く誘導できるイムノリボソーム、及び腫瘍細胞にマグネタイト又は遺伝子を選択的に導入して温熱又は遺伝子治療のベクターとしての特徴を有するイムノリボソーム、ならびにそれらの調製方法に関する。

【0002】

【従来技術】

1. セラミド又は抗Fas抗体
アポトーシスは、プログラム細胞死（正常な発生、分化

に不可欠な条件としての特定の時期に特定の部位に生じる生理的細胞死)の代表的な死の様式であり、形態学的にはクロマチン凝縮、細胞質濃縮、核濃縮とそれらの断片化、膜被包性球状小体化、隣接するマクロファージや上皮細胞などによる球状小体の貪食、消化を特徴としている。従来のがん治療（化学療法、放射線療法等）においては腫瘍細胞の多くはネクローシスにて細胞死がもたらされていた。ネクローシスはアポトーシスと異なり周囲組織に炎症反応を惹起するため、発熱、悪心、嘔吐等強い有害作用が伴っていた。一方アポトーシスは周囲組織に炎症反応を伴わないため有害作用はきわめて少ないと予想される。したがって腫瘍細胞をアポトーシスにて細胞死に至らしめることは臨床応用を展望した際、有害作用を少なくし、効率のよい治療法を導くのに有効であると考えられる。

【0003】アポトーシスの機構は多様で、まだ解明されていない点が多いが、セラミドの関与するスフィンゴミエリン代謝経路は、サイトカインのひとつであるTNF- α （腫瘍壊死因子）が誘導するプログラム細胞死のアポトイックカスケード中の初期イベントを構成すると見られている [Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz DA, Grant S, Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 73-77 (1994)]。またスフィンゴミエリンの加水分解によってできるセラミドはアポトーシスだけでなく、細胞増殖及び分化におけるTNF- α の影響を仲介する第二のメッセンジャーであると考えられている [Kolesnick R, Golde DW, The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling, Cell, 77, 325-328 (1994)]。ある種類の細胞において、TNF- α で刺激すればアポトーシスが誘導される。グリオーマ細胞においても一部でアポトーシスの誘導が高用量の場合に限り認められるが、むしろそれは例外的で多くのグリオーマ細胞ではアポトーシスは誘導されない。一方で合成セラミド類縁体であるC2-セラミドをエタノールに溶解して効率よく細胞膜を透過させ、アポトーシスを誘導する方法を示す論文がみられる [Obleid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA, Programmed cell death induced by ceramide, Science, 259, 1769-1771 (1993)] が、グリオーマ細胞では顕著なアポトーシスの誘導はこの方法でも認められない。この事実は種々の細胞にアポトーシスを誘導する抗Fas抗体をグリオーマ細胞に添加したときにも言える。抗Fas抗体は各種細胞にアポトーシスを誘導できる代表的な抗体として特徴づけられているがグリオーマ細胞では高用量の場合のみにその感受性がわずかに認められる。したがって従来ではセラミド又は抗Fas抗体を用いてグリオーマ細胞に効率よくアポトーシスを誘導するためには別のアプローチが望まれるところである。

【0004】2. マグネタイト又は遺伝子

磁性微粒子であるマグネタイトは局所温熱療法の新しい担い手として注目を集めている。磁性微粒子としてのマグネタイトの発熱機構やその特徴はすでに詳細な検討がなされており、温熱誘導体としての地位は確立されつつある[Shinkai M, Suzuki M, Iijima S, Kobayashi T, Antibody-conjugated magnetoliposomes for targeting cancer cells and their application in hyperthermia, Biotechnol. Appl. Biochem, 21, 125-137 (1994)]。したがって局所温熱療法の成功は腫瘍細胞に効率的にマグネタイトを導入できるかにかかっている。

【0005】一方、現在多くのヒト遺伝子治療が米国を中心として開始されており、安全性が高く、導入効率も高い脂質カプセルであるリボソームを遺伝子の担体として用いる研究がなされている。例えば、Felgnerらはカチオン性リボソームが核酸やタンパク質を種々の細胞へ運搬する効率的で簡便な手段であることを提供し、また *in vivo* 遺伝子導入において多くの利点を有するものであることを証明した[Felgner PL, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7414 (1987), Felgner P L, et al., Nature, 337, 387-388 (1989)]。八木らは、リボソームによる遺伝子導入についてプラスミドのリボソームへの包埋率(リボソーム中に物質を入れることを包埋するという)、細胞への遺伝子導入及び発現効率の面から研究を行ない、リボソームに正の電荷を与える材料として、N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D-グルタメイトクロリド(TMAG)を選択し、これとジラウロイルホスファチジルコリン(DLPC)、及びジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)を一定の比率で組み合わせて調製したカチオン性リボソームが高いDNAの取り込みを示し[Koshizaka T, Hayashi Y, Yagi K, Novel liposomes for efficient transfection of β -galactosidase gene into COS-1 cells, J. Clin. Biochem. Nutr. 7, 185-192 (1989)]、また振盪のみにより調製する多重層リボソームでは調製法が簡便である上、安全性が高いことを報告している[Yagi K, Noda H, Kurono M, Ohishi N, Effective gene transfer with less cytotoxicity by means of cationic multilamellar liposomes, Biochem. Biophys. Res. Commun 3, 1042-1048 (1993)]。さらに、カチオン性リボソームのもうひとつの利点は、モノクローナル抗体やリガンドを結合させることによって、特異的な細胞にリボソームを攻撃させることである。本発明者らは八木らと共同にて前記のカチオン性リボソームを用いたヒトグリオーマに対するターゲティング(targeting)療法について研究し、遺伝子導入された細胞の10~20%が *in vitro* でリボソーム-媒介遺伝子導入後に該遺伝子を発現すること、及びリボソームに抗ヒトグリオーマ細胞モノクローナル抗体G-22を結合させることにより、導入効率と腫瘍細胞特異性が向上することを

証明した[Mizuno M, Yoshida J, Sugita K, Inoue I, Seo H, Hayashi Y, Koshizaka T, Yagi K, Growth inhibition of glioma cells transfected with the human β -interferon gene by liposomes coupled with a monoclonal antibody. Cancer Res, 50, 7826-7829 (1990)]。又、これらのモノクローナル抗体のリボソームへの結合は、化学反応、例えばLesermanら[Leserman et al., Nature, 288, 602-604 (1980)]に従い、架橋剤、N-ヒドロキシスクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)を用いることによって行なわれていたものを、本発明者は本研究において化学反応を行なうことなく、振盪するだけという独自の方法により、リボソームへの包埋率、腫瘍細胞への遺伝子導入及び発現効率に優れたイムノリボソームを調製した。

【0006】以上の知見に基づき、セラミド又は抗Fas抗体又はマグネタイト又は遺伝子の腫瘍細胞への導入に、上記のようなイムノリボソームの利用の可能性が大いに期待されるところである

【0007】

【本発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、腫瘍細胞にセラミド又は抗Fas抗体を選択的に導入してアポトーシスを効率良く誘導できるイムノリボソーム、及び腫瘍細胞にマグネタイト又は遺伝子を選択的に導入して温熱又は遺伝子治療のベクターとしての特徴を有するイムノリボソーム、ならびにそれらの調製方法を提供することである。

【0008】

【課題を達成するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく研究を重ねた結果、セラミド、抗Fas抗体、マグネタイト又は遺伝子を腫瘍細胞に選択的に反応するモノクローナル抗体G-22(抗CD44抗体)を結合させたカチオン性リボソームに封入又は包埋させることにより、これらを効率よくかつ選択的に腫瘍細胞に導入できることを証明した。さらに前二者では導入によりグリオーマ細胞にアポトーシスを効率よく誘導できることを見出し、本発明を完成した。

【0009】すなわち本発明は、セラミド、抗Fas抗体、マグネタイト及び遺伝子から成る群から選ばれる抗腫瘍活性物質を腫瘍細胞に選択的に反応するモノクローナル抗体(抗CD44抗体)を結合させたカチオン性リボソームに封入又は包埋したことを特徴とするイムノリボソームならびにその調製方法に関する以下に本発明を具体的に説明する。

【0010】

【発明の実施の形態】

リボソーム膜

本発明の基礎となるリボソーム膜はジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDAB)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)の2種類の脂質とCD44を過剰発現している腫瘍細胞(グリオーマ細胞、メ

5

ラノーマ細胞、肺癌細胞等)に選択的に反応するモノクローナル抗体(抗CD44抗体)で構成される。リボソームの形状の安定化をはかるためジラウロイルホスファチジルコリン(DLPC)等のコリン脂質を添加する場合もある。構成脂質のひとつであるDDABは正の電荷をリボソームに与える脂質である。かかる脂質を利用することによりリボソームの内外両面が正に荷電され、その結果、負の電荷を有する腫瘍細胞への添加物、すなわち本発明にいう各種抗腫瘍活性物質(セラミド又は抗Fas抗体又はマグネタイト又は遺伝子)の導入効率が向上する。さらに遺伝子ではそのものが負の電荷を有していることよりリボソーム調製の際の封入又は包埋効率の向上にもつながっている。脂質の構成モル比はDDAB、DOPEで2:1又は1:2とすることが例示され、適当量の添加物を加えてもよい。

【0011】腫瘍細胞に導入する抗腫瘍活性物質

本発明において腫瘍細胞へ導入する抗腫瘍活性物質は、腫瘍細胞に導入されて抗腫瘍効果を発揮しうるものであればその機構は問わない。具体的には腫瘍細胞に選択的に導入されてアポトーシスを効率良く誘導できるもの、例えばセラミド(C₂若しくはC₆セラミド又はその他のアポトーシスを誘導できるセラミド類縁体)、抗Fas抗体、又は腫瘍細胞に選択的に導入されて温熱治療効果を発揮しうるマグネタイト、さらには抗腫瘍に有効な遺伝子をいう。抗腫瘍に有効な遺伝子としては、好適には自殺遺伝子、具体的にはヘルペスシンプレックスチミジンキナーゼをコードする遺伝子、又はサイトカイン遺伝子、具体的にはインターフェロン(IFN)- α 、 β 、 γ 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン(IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、腫瘍壊死因子(TNF)- α 、リンホトキシン(LT)- β 、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)、白血病抑制因子(LIF)、T細胞活性化共刺激因子B7(CD80)及びB7-2(CD86)、キット・リガンド、オンコスタチンM等の各種サイトカインをコードする遺伝子が挙げられる。本発明において使用される上記の遺伝子は、公知の技術を用いて細胞から単離して得られたcDNAであっても、また公知の文献等に開示される情報よりポリメレース連鎖反応(PCR)等の方法に従って化学的に合成されたものであってもよいが、免疫的拒絶反応を最小に抑えるために、また、治療効果を上げるために、ヒト由来のものが望ましい。

【0012】G-22モノクローナル抗体(抗CD44抗体)

本発明者らの研究によりヒトグリオーマ細胞、メラノーマ細胞、又は肺癌細胞の一部はリンパ球のhoming receptorとして同定されたCD44が過剰に発現しているという事実が見い出されている。この事実に基づき、ヒトグリ

6

オーマ細胞に対する特異的抗体(抗CD44抗体)の作製が行われた[Wakabayashi T, Yoshida J, Seo H, et al., Characterization of neuroectodermal antigen by a monoclonal antibody and its application in CSF diagnosis of human glioma. J Neurosurg, 68, 449-455 (1988), Okada H, Yoshida J, Seo H, et al., Anti-(glioma surface antigen) monoclonal antibody G-22 recognized overexpressed CD44 in glioma cells. Cancer Immunol. Immunother. 39, 313-317 (1994)]。作製は、常套的な手段、すなわち該細胞上に発現される抗原で免疫化したマウスの脾細胞と骨髓腫細胞を融合し、得られたハイブリドーマを培養することによって行うことができる。またモノクローナル抗体は、全IgGであっても、その一部、例えばF(ab')₂のいずれであってもよい。

【0013】腫瘍細胞

本発明においてイムノリボソームによる治療の対象となる腫瘍細胞はCD44過剰発現細胞であるグリオーマ細胞、メラノーマ細胞又は肺癌細胞等である。

【0014】イムノリボソームの調製

本発明のイムノリボソームの調製方法としては、多重層リボソームの調製の際の常套的な手段である振盪法に若干の改良を加えた方法にて行いうる。具体的にはクロロホルムに溶解した前記の脂質ないし混合脂質(セラミドの場合はクロロホルムに溶解後この時点でリボソーム脂質といっしょに混合する)をスピッツに加え、ロータリーエバポレータにて溶媒を蒸発させリボソーム膜を調製する。これに抗Fas抗体又はマグネタイト又は遺伝子を含むリン酸緩衝液を加え、さらにG-22モノクローナル抗体(抗CD44抗体)を1 μ molに対して2ngから2 μ gの割合で添加し、1から5分間振盪する。脂質と他の添加物(モノクローナル抗体を含む)の混合比は脂質1 μ molあたりモノクローナル抗体は2ngから2 μ g、マグネタイトは5から30 μ g、遺伝子は5から30 μ gが例示される。

【0015】製剤化

クロロホルムに溶解した前記の脂質ないし混合脂質(セラミドの場合はクロロホルムに溶解後この時点でリボソーム脂質といっしょに混合する)をスピッツに加え、ロータリーエバポレータにて溶媒を蒸発させリボソーム膜を調製する。この方法に準じリボソーム膜のバイアル化を計り滅菌保存する。脂質の酸化を防ぐため冷所保存が望ましい。一方、その他の添加物である抗体又はマグネタイト又は遺伝子はそれぞれ別のバイアルとし、保存する。この場合も冷所保存が望ましい。この添加物のバイアル(場合によっては2種類)とリボソーム膜のバイアルを使用直前に混合し、振盪後使用する。

【0016】本発明のイムノリボソームの投与形態としては、腫瘍病巣又は腫瘍に対応した予想播種又は転移部位に対して局所注射する他、場合によっては通常の静脈

内、動脈内等の全身投与が挙げられる。本発明のイムノリボソームの投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数によって異なるが、成人一日当り、脂質量に換算して10から1000nmolの範囲とすることが適当である。

【0017】

【実施例】本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明する。これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】セラミド含有イムノリボソームの調製

(1) セラミド及びリボソーム用脂質

C2-セラミドをMATREYA INC., Pleasant Gap, PA, USAより; ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DAB), ジラウロイルホスファチジルコリン(DLPC)をSigma Chemical Co., St., Louis, MOより; そしてジオレイルホスファチジレータノールアミン(DOPE)をAvanti Polar Lipids, Birmingham, ALより購入し、これを用いた。

【0018】(2) G-22 モノクローナル抗体の調製

ヒトグリオーマ細胞の表面抗原(CD44)に特異的なG-22モノクローナル抗体(マウスIgGモノクローナル抗体)は、Wakabayashi, T. et al., J. Neurosurg., 68, 449-455, (1988)の記載に従って行った。まずヒトグリオーマ細胞株SK-MG-4で免疫化したマウスの脾臓細胞をマウスミエローマ細胞株NS-1とDippold WG, Lloyd KO, Li LYC et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6114-6118 (1980)に従って融合した。グリオーマ細胞、神経芽腫、及び他の腫瘍細胞由来の培養細胞株のパネル上における培養上清中の抗体活性をモニターしながら、ハイブリドーマを選択し、限界希釈法にてクローニングを行った。選択したハイブリドーマをBALB/cマウスに接種し、腹水より目的とするモノクローナル抗体を得た。

【0019】(3) リボソームの調製

リボソームの調製は、多重層リボソームの調製の際の常套的手段である振盪法に若干の改良を加えた簡便法により行った。まず、DAB、DOPE及びC2-セラミドを1:2:2又は1:2:4(全量2 μ mol)の割合でクロロホルムに溶解混合し、シリコン化した試験管の底でロータリーエバポレーターを用いて溶媒除去した。この脂質フィルムに、(2)で調製した2 μ gのG-22モノクローナル抗体を含むダルベッコのリン酸緩衝液500 μ lを加えた。脂質フィルムとリン酸緩衝液を含む試験管を混合物が清浄になるまで1~5分間振盪することによって、目的とするセラミド-イムノリボソームを得た。

【0020】(4) セラミドの腫瘍細胞への導入

ヒトグリオーマ細胞 U-251SP, SK-MG-1, 及びT98Gを10%ウシ胎児血清(FCS)、ストレプトマイシン(100 μ g/ml)、ペニシリン(100U/ml)、4mM L-グルタミン酸及び非必須アミノ酸を添加したDulbecco's minimum essential medium (DMEM)で維持した。

【0021】上記グリオーマ細胞の培養培地懸濁液(7.5 $\times 10^4$ cells/ml)2mlをファルコン(Falcon)プレート(#3046)の各ウェルに播き、5%CO₂、95%空気の湿雰囲気下、37°Cで24時間インキュベートした。リボソーム溶液30 μ l(60nmol脂質)を、モル比率が1:2:2(=DAB:DOPE:C2-セラミド)のときセラミドの最終濃度が12 μ Mとなるように、又はモル比率が1:2:4(=DAB:DOPE:C2-セラミド)のときセラミドの最終濃度が24 μ Mとなるように培養培地に加えた。37°Cで16時間培養後、培地を交換し、細胞をさらに37°Cで一定時間インキュベートした。コントロールとなる空リボソームをDAB、DLPC、及びDOPEを用い、モル比率をそれぞれ1:2:2で調製した。

【0022】〔試験例1〕

(1) DNA断片化の分析

(方法)DNA断片化の分析を、[Jarvis WD, Kolesnik RN, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz DA, Grant S, Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 73-77 (1994)]に記載の方法に若干の改良を加えた2%アガロースゲル電気泳動によって行った。セラミド-イムノリボソーム(24 μ M)処理2日後、浮遊細胞又は固着細胞を回収し、0.5% SDS/0.1 M NaCl/1mM EDTA, pH7.5に溶解し、その溶解液をプロテナーゼK(100 μ g/ml)で50°C、12時間処理した。プロテナーゼKを94°C、5分間熱変性することによって不活化し、1/10容量の3M酢酸ナトリウム及び2.5倍容量の冷エタノールをDNAを沈殿させるために加えた。溶解液を-70°Cで15分保持し、30,000 \times gで10分間遠心分離した。最後にペレットをTE20 μ lに溶解し、0.4 μ g/mlのエチジウムブロミドを含む2%アガロースゲルで電気泳動した。解像パターンはUV光下で可視化した。

【0023】(結果)セラミド-イムノリボソームにて処理した培養細胞から抽出したDNAは、アポトーシスの特徴であるオリゴヌクレオソームDNA断片のハシギ型の電気泳動プロフィールを示した(図1)。

【0024】(2) セラミド-リボソームの培養細胞に対する抗腫瘍効果

(方法)セラミド-イムノリボソーム、又は抗体を結合させずに同様に調製したセラミドリボソーム[モル比率1:2:2(=DAB:DOPE:C2-セラミド); 培地中のセラミド最終濃度12 μ M、又はモル比率1:2:4(=DAB:DOPE:C2-セラミド); 培地中のセラミド最終濃度24 μ M]を用い、培養グリオーマ細胞に導入したセラミドの成長阻害効果を調べた。培養グリオーマ細胞にリボソーム処理して48時間後、ヘモサイトメーター下でトリパンブルー染色を排除した生細胞数の計測によって評価した。コントロールとして、空リボソーム又はエタノール-溶解セラミド(エタノール中4mM)による処理を行った。

【0025】(結果)表1において、細胞毒性(%), 即ち未処理細胞に対する生存細胞数の減少率を各リボソ

ーム型及び細胞株について示した。コントロールの空リボソームによっては何ら顕著な細胞毒性は観察されなかったのに対し、セラミドリボソーム $12\mu\text{M}$ では3種全ての細胞において細胞毒性が表れ、セラミドーイムノリボソーム $12\mu\text{M}$ では、さらに高い細胞毒性を示し、抗体の結合によりさらに効果が上昇することがわかった。エタノール溶解リボソームの場合と比較した student-t test ($p<0.01$)による統計的差異は、セラミドーイムノリボソームにより処理したU-251SP 及びSK-MG-1、ならびにセラミドーイムノリボソーム処理の全ての細胞において見ら*10

*れた。

【0026】また、セラミドリボソーム $24\mu\text{M}$ はセラミドリボソーム $12\mu\text{M}$ に比べて高い細胞毒性を示し、その効果は用量依存的であることがわかるが、その用量依存性は、セラミドーイムノリボソームにおいても同様に見られた。また、SK-MG-1 及びT98Gに統計的差異が見られた。

【0027】

【表1】

処理リボソーム	細胞株		
	U-251SP	SK-MG1	T98G
空リボソーム	2.0 \pm 0	5.8 \pm 2	8.1 \pm 1.2
エタノール溶解セラミド (12 μM)	7.5 \pm 1	35.4 \pm 2	50.0 \pm 2.4
セラミドリボソーム (12 μM)	34.7 \pm 2 *	54.6 \pm 1.5 *	60.6 \pm 1.4
セラミドーイムノリボソーム(12 μM)	56.3 \pm 2.5 *	63.8 \pm 1.5 *	80.3 \pm 0.7 *
エタノール溶解セラミド (24 μM)	33.1 \pm 1.5	39.2 \pm 3	56.1 \pm 2.4
セラミドリボソーム (24 μM)	44.2 \pm 2.5	69.1 \pm 0.35*	81.8 \pm 0.3 *
セラミドーイムノリボソーム(24 μM)	61.8 \pm 2	72.4 \pm 1.7 *	86.3 \pm 0.6 *

細胞毒性(%)

* 統計的差異あり student-t test ($p<0.01$)

【0028】[実施例2] 抗Fas抗体含有イムノリボソームの調製

(1) 抗Fas抗体及びリボソーム用脂質

抗Fas抗体はMedical and biological laboratories (MBL), Co., Ltd., Nagoya, Japanより購入した。リボソーム用脂質は前記のごとくである。

【0029】(2) G-22モノクローナル抗体(抗CD44抗体)

前記のごとくである。

【0030】(3) 抗Fas抗体含有イムノリボソームの調製

抗Fas抗体含有イムノリボソームの調製は多重層リボソームの調製の際の常套的な手段である振盪法に若干の改良を加えた方法にて行なった。まずリボソームの形状の安定化をはかる目的にてジラウロイルホスファチジルコリン(DLPC)等のコリン脂質を添加した。すなわちDDA、DOPE、コリン脂質をそれぞれモル比で1:2:2又は1:3:2の割合でクロロホルムに溶解混合し、シリコン化したスピッツの底でロータリーエバポレータを用いて溶媒の除去を行なった。この脂質フィルム(リボソーム膜)にリン酸緩衝液に溶解した抗Fas抗体を脂質総量 $1\mu\text{mol}$ に対して2ngから $2\mu\text{g}$ の割合で添加し、さらにG-22モノクローナル抗体(抗CD44抗体)を脂質※

※総量 $1\mu\text{mol}$ に対して2ngから $2\mu\text{g}$ の割合で添加し、1から5分間振盪した。さらにその後リン酸緩衝液を加え、全量を $500\mu\text{l}$ に調製した。この方法にて目的とする抗Fas抗体含有イムノリボソームを得た。

【0031】[試験例2] 抗Fas抗体含有イムノリボソームの培養細胞に対する抗腫瘍効果

(1) 抗Fas抗体含有イムノリボソームの培養細胞に対する抗腫瘍効果

(方法) 抗Fas抗体含有イムノリボソームを $15\text{ないし}30\text{nmol脂質/ml}$ の割合で培養グリオーマ細胞に添加し、グリオーマ細胞の成長阻害効果を調べた。対象としてフリーの抗Fas抗体を同量添加した。

【0032】(結果) 表2において、細胞毒性(%), 即ち未処理細胞に対する生存細胞数の減少率を各リボソーム型及び細胞株について示した。抗Fas抗体及び抗Fas抗体含有イムノリボソームのいずれにおいてもすべての培養細胞株にて細胞毒性が観察された。その細胞毒性はフリーの抗Fas抗体を添加した場合よりも抗Fas抗体含有イムノリボソームのほうが統計学的に有意な差をもって強いものであった。またその細胞毒性の形態はTUNEL法によりアポトーシスであることが証明された。

【0033】

【表2】

細胞株

	1 1		1 2
	U-251 SP	SK-MG-1	T98G
空のリボソーム	1.2 ± 0.3	4.2±1.8	5.0±1.1
抗Fas抗体			
0.1 μg	4.3 ± 0.7	2.5±0.4	3.2±1.5
1.0 μg	8.4 ± 2.5	10.1±2.1	12.7±3.0
100 μg	56.7 ± 4.4	60.3±3.8	58.9±5.5
リボソーム			
抗体量			
0.1 μg	52.2 ± 3.8	48.3±5.4	50.1±6.3
1.0 μg	78.4 ± 4.5	67.5±4.7	67.4±3.8
イムノリボソーム			
抗体量			
0.1 μg	69.3 ± 4.1	64.5 ± 3.4	66.6±4.2
1.0 μg	88.7 ± 6.3	80.5 ± 7.1	85.3±3.9

【0034】[実施例3] マグネタイト含有イムノリボソームの調製

(1) マグネタイト及びリボソーム用脂質

マグネタイトは、Sinkai M, Honda H, Kabayashi T, Preparation of fine magnetic particles and application for enzyme immobilization Biocatalysis, 5, 61-69 (1991)の方法に従い調製した。

【0035】リボソーム用脂質は前記のごとくである。

【0036】(2) G-22モノクローナル抗体(抗CD44抗体)

前記のごとくである。

【0037】(3) マグネタイト含有イムノリボソームの調製

マグネタイト含有イムノリボソームの調製は多重層リボソームの調製の際の常套的な手段である振盪法に若干の改良を加えた方法にて行なった。まず形状の安定化をはかる目的にてジラウロイルホスファチジルコリン(DLPC)等のコリン脂質を添加した。DDAB、DOPE、コリン脂質をそれぞれモル比で1:2:2の割合でクロロホルムに溶解混合し、シリコン化したスピッツの底でロータリーエバポレータを用いて溶媒の除去を行なった。この脂質フィルム(リボソーム膜)にリン酸緩衝液に溶解したマグネタイトを脂質総量1 μmolに対して20 μgの割合で添加し、さらにG-22モノクローナル抗体(抗CD44抗体)を脂質総量1 μmolに対して2 ngから2 μgの割合で添加し、1から5分間振盪した。さらにその後リン酸緩衝液を加え、全量を500 μlに調製した。この*

*方法にて目的とするマグネタイト含有イムノリボソームを得た。

【0038】[試験例3] マグネタイト含有イムノリボソームによる培養細胞の鉄の取り込み

(1) マグネタイトの取り込み

(方法) マグネタイト含有イムノリボソームを15ないし30 nmol脂質/mlの割合で培養グリオーマ細胞に添加し、グリオーマ細胞のマグネタイトの取り込み量を調べた。対象としてフリーのマグネタイトを同量添加した。細胞内のマグネタイトの取り込み量は細胞を濃塩酸で溶解後、TCAにて細胞溶解物を除去し、StClを添加し、原子吸光分析にてマグネタイトの濃度を測定し、マグネタイト量を算出した。

【0039】(結果) 表3において、培養グリオーマ細胞に取り込まれたマグネタイトの量を各リボソーム型について示した。同量のフリーのマグネタイトを培養グリオーマ細胞に添加したときには細胞内へのマグネタイトの取り込みはほとんど観察されなかった。一方、マグネタイト含有イムノリボソームでは大量のマグネタイトの取り込みが観察された。その取り込み量は従来のホスファチジルコリンやホスファチジルセリン又はコレステロールといった脂質で調製されたリボソームの10倍以上であった。また鉄の取り込み量は抗CD44抗体を結合させたイムノリボソームで抗CD44抗体を結合していない通常リボソームより有意に高まった。

【0040】

【表3】

	細胞株		
	U-251 SP	SK-MG-1	T98G
リボソーム			
	17.0	18.0	19.0
イムノリボソーム			

数値はマグネタイト含有リボソーム又はイムノリボソーム投与後16時間での細胞ひとつあたりのマグネタイトの取り込み量 (pg-Fe304/cell) を示す。

【0041】〔実施例4〕 遺伝子含有イムノリボソームの調製

(1) 遺伝子及びリボソーム用脂質

遺伝子はpCH110 (ファルマシアより購入)、pSV21FN- β (東レ株式会社より供与) 等の真核細胞発現ベクターを用いた。リボソーム用脂質は前記のごとくである。

【0042】(2) G-22モノクローナル抗体 (抗CD44抗体)

前記のごとくである。

【0043】(3) 遺伝子含有イムノリボソーム調製

遺伝子含有イムノリボソームの調製は多重層リボソームの調製の際の常套的な手段である振盪法に若干の改良を加えた方法にて行なった。まず形状の安定化をはかる目的にてジラウロイルホスファチジルコリン (DLPC) 等のコリン脂質を添加した。DDAB、DOPE、コリン脂質をそれぞれモル比で1:2:2の割合でクロロホルムに溶解混合し、シリコン化したスピッツの底でロータリーエバポレータを用いて溶媒の除去を行なった。この脂質フィルム (リボソーム膜) にリン酸緩衝液に溶解した遺伝子を脂質総量1 μ mol に対して20 μ g の割合で添加し、さ*

*らにG-22モノクローナル抗体 (抗CD44抗体) を脂質総量1 μ mol に対して2ngから2 μ g の割合で添加し、1から5分間振盪した。さらにその後リン酸緩衝液を加え、全量を500 μ l に調製した。この方法にて目的とする遺伝子含有イムノリボソームを得た。

【0044】〔試験例4〕 遺伝子含有イムノリボソームによる培養細胞での遺伝子の発現

(1) 遺伝子の発現

(方法) 遺伝子含有イムノリボソームを15ないし30 nmol脂質/mlの割合で培養グリオーマ細胞に添加し、グリオーマ細胞での導入遺伝子の発現を調べた。対象としてフリーの遺伝子を同量添加した。

【0045】(結果) 表4において、培養グリオーマ細胞に導入された遺伝子の発現を各リボソーム型について示した。同量のフリーの遺伝子を培養グリオーマ細胞に添加したときにはその発現は全く観察されなかった。一方遺伝子含有イムノリボソームではその発現が観察された。また導入遺伝子の発現は抗CD44抗体を結合させたイムノリボソームで抗CD44抗体を結合していない通常リボソームより有意に高まった。

【0046】

【表4】

	細胞株		
	U-251 SP	SK-MG-1	T98G
空のリボソーム	2.5 >	2.5 >	2.5 >
フリーの遺伝子	2.5 >	2.5 >	2.5 >
リボソーム			
7.5 nmol	23.8 \pm 4.0	30.7 \pm 4.8	39.8 \pm 8.8
15.0 nmol	52.0 \pm 7.8	60.8 \pm 5.6	77.8 \pm 12.7
30.0 nmol	126.3 \pm 12.1	112.1 \pm 10.7	168.3 \pm 17.5
イムノリボソーム			
7.5 nmol	85.0 \pm 7.6	88.9 \pm 8.5	63.3 \pm 9.7
15.0 nmol	175.8 \pm 10.8	170.5 \pm 11.6	140.8 \pm 15.3
30.0 nmol	256.3 \pm 15.7	240.4 \pm 14.7	263.3 \pm 19.5

数値は遺伝子導入後4日目の培養液中の β -インターフェロン濃度 (IU/ml) を示す。

【0047】

【発明の効果】本発明のセラミド含有イムノリボソーム又は抗Fas抗体含有イムノリボソームによれば、腫瘍細胞にセラミド又は抗Fas抗体を効率よくかつ選択的に導入してアポトーシスを誘導できるので、悪性腫瘍に対する治療に効果的である。またこれらはアポトーシスの機構の解明に役立つと考えられる。

【0048】本発明のマグネタイト含有イムノリボソーム※50

※ムによれば、フリーに添加されたマグネタイトよりはるかに効率よく腫瘍細胞にマグネタイトを導入できるので、悪性腫瘍に対する局所温熱治療に効果的である。本発明の遺伝子含有イムノリボソームによれば、効率よく遺伝子を腫瘍細胞に導入でき、発現できるので、悪性腫瘍に対する遺伝子治療に効果的である。

【図面の簡単な説明】

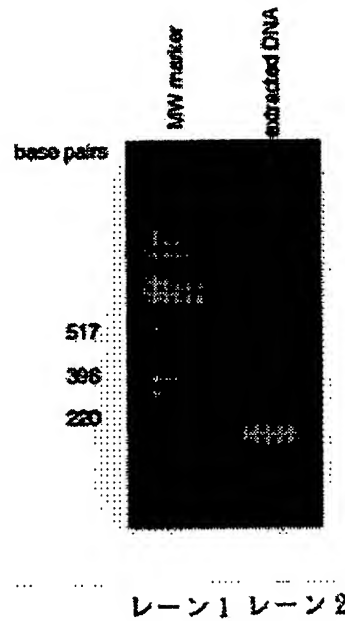
【図1】 セラミドイムノリボソーム処理によりグリ

オーマ細胞から抽出したDNAのアガロースゲル電気泳動写真を示す。

レーン1：分子量マーカー
レーン2：抽出DNA

【図1】

図面代用写真



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 33/26			A 6 1 K 33/26	
			39/395	T
			48/00	
			A 6 1 N 1/40	
// A 6 1 N 1/40			A 6 1 K 37/20	

(72)発明者 岡田 秀穂
愛知県名古屋市昭和区川名町4-26ミラ川
名301号

— COMPUTER TRANSLATION —
PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **09-110722**

(43)Date of publication of application : **28.04.1997**

(51)Int.Cl.

A61K 45/00
A61K 9/127
A61K 31/16
A61K 31/70
A61K 33/26
A61K 31/715
A61K 39/395
A61K 48/00
// A61N 1/40

(21)Application number : **07-295918**

(71)Applicant : **TORAY IND INC**

(22)Date of filing : **20.10.1995**

(72)Inventor : **YOSHIDA JUN**

KOBAYASHI TAKESHI
HAGIWARA MASATOSHI
MIZUNO MASAOKI
OKADA HIDEHO

(54) IMMUNOLIPOSOME FOR TRANSDUCING TUMOROUS CELL OF ANTITUMOR ACTIVE SUBSTANCE AND ITS PREPARATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce an immunoliposome, capable of effectively and selectively transducing an antitumor active substance into a tumorous cell by bonding a cationic liposome membrane containing the antitumor active substance to a specific antibody selectively reactive with the tumorous cell.

SOLUTION: This immunoliposome for transducing an antitumor active substance into a tumorous cell is obtained by bonding a cationic liposome membrane containing the antitumor active substance to a monoclonal antibody G-22 (antiCD 44 antibody) selectively reactive with the tumorous cell. A ceramide or an antiFas antibody capable of efficiently inducing apoptosis, a magnetite capable of manifesting hyperthermic effects and a gene effective in antitumor effects are preferred as the antitumor active substance. Dimethyldioctadecylammonium bromide and dioleoylphosphatidylethanolamine are preferred as a lipid constituting the cationic liposome membrane. A cell of a glioma, a cell of melanoma, etc., which are cells excessively expressing CD44 are preferred as the tumorous cell to be an object of treatment.

Furthermore, the daily dose of the immunoliposome for an adult is preferably 10-1000nmol

expressed in terms of the amount of the lipid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 04.10.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Immuno liposome characterized by making the cationic liposome film containing the antitumor activity matter combine the monoclonal antibody G-22 (anti-CD44 antibody) which reacts alternatively at a tumor cell.

[Claim 2] Immuno liposome according to claim 1 as which the antitumor activity matter is chosen from ceramide, an anti-Fas antibody, magnetite, and the group that consists of a gene.

[Claim 3] Immuno liposome according to claim 2 whose gene is a suicide gene or a cytokine gene.

[Claim 4] Cytokine is interferon (IFN) - alpha, beta, gamma, a granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), (Interleukin IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, and IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, tumor necrosis factor (TNF) - alpha, Lymphotoxin (LT) - beta and a granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), A macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and a macrophage migration inhibition factor (MIF), Immuno liposome according to claim 3 chosen from the group which consists of a leukemia inhibitory factor (LIF), the T cell activation costimulatory factor B7 (CD80) and B7-2 (CD86), kit ligand, and Oncostatin M.

[Claim 5] Immuno liposome according to claim 1 in which the lipid which constitutes the cationic liposome film contains dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDAB) and dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE).

[Claim 6] Immuno liposome according to claim 1 whose tumor cell is a CD44 superfluous manifestation cell.

[Claim 7] Immuno liposome according to claim 6 whose CD44 superfluous manifestation cells are a GURIOA cell, a melanoma cell, and a lung cancer cell.

[Claim 8] The preparation approach of the immuno liposome characterized by adding the monoclonal antibody G-22 (anti-CD44 antibody) which reacts alternatively to a tumor cell, mixing on the cationic liposome film containing the antitumor activity matter, and shaking at it.

[Claim 9] The preparation approach of immuno liposome according to claim 8 that the antitumor activity matter is chosen from ceramide, an anti-Fas antibody, magnetite, and the group that consists of a gene.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the immuno liposome which introduces ceramide or an anti-Fas antibody into a tumor cell alternatively, and can guide apoptosis efficiently, the immuno liposome which introduces magnetite or a gene into a tumor cell alternatively, and has the description as a vector of warm temperature or gene therapy, and those preparation approaches.

[0002]

[Description of the Prior Art]

1. Ceramide or anti-Fas antibody apoptosis is the format of the typical death of programmed cell death (physiological cell death produced to a specific part at the specific stage as conditions indispensable to normal generating and differentiation), and is morphologically characterized by the phagocytosis of the corpuscula bulboidea by chromatin condensation, cytoplasm concentration, pyknosis, those fragmentation, the formation of the film encapsulated corpuscula bulboidea, an adjoining macrophage, an epithelial cell, etc., and digestion. In the conventional cancer therapies (a chemotherapy, radiotherapy, etc.), as for many of tumor cells, cell death was brought about in necrosis. In order to cause an inflammatory response in a perimeter organization unlike apoptosis, strong adverse reactions, such as fever, nausea, and vomiting, were accompanied by necrosis. On the other hand, apoptosis is expected that there is very little adverse reaction in order not to follow an inflammatory response on a perimeter organization. Therefore, when clinical application is viewed, making a tumor cell result in cell death in apoptosis lessens adverse reaction, and it is thought that it is effective in drawing an efficient cure.

[0003] Although the device of apoptosis is various and there are many points which are not solved yet, the sphingomyelin metabolic fate in which ceramide participates [Jarvis WD currently expected to constitute the initial event in the APOTAIKKU cascade of the programmed cell death which TNF-alpha (tumor necrosis factor) which is one of the cytokine guides, Kolesnick RN, and Fornari FA, Traylor RS, and Gewirtz DA, Grant S Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 91, 73-77 (1994)]. Moreover, it is thought that the ceramide made by hydrolysis of sphingomyelin is the second messenger cable who mediates the effect of TNF-alpha not only in apoptosis but cell proliferation and differentiation [Kolesnick R, Golde DW, The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling, Cell, 77, and 325-328] (1994). It sets into a certain kind of cell, Apoptosis will be guided if it stimulates by TNF-alpha. Although it restricts and accepts when induction of apoptosis is a high dose partly also in a GURiOMA cell, rather, it is exceptional and apoptosis is not guided in many GURiOMA cells. On the other hand, dissolve the C2-ceramide which is a synthetic ceramide analog in ethanol, a cell membrane is made to penetrate efficiently, and, as for induction of remarkable apoptosis, [Obleid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA, Programmed cell death induced by ceramide, Science, 259, and 1769-1771] (1993) as which the paper in which how to guide apoptosis is shown is regarded are not accepted by this approach in a GURiOMA cell, either. This fact can be said also when the anti-Fas antibody which guides apoptosis

to various cells is added into a GURIOMA cell. Although the anti-Fas antibody is characterized as a typical antibody which can guide apoptosis to various cells, only in a high-dose case, in a GURIOMA cell, the susceptibility is accepted slightly. Therefore, by the conventional approach, in order to guide apoptosis to a GURIOMA cell efficiently using ceramide or an anti-Fas antibody, another approach is just going to desire.

[0004] 2. The magnetite which is magnetite or a gene magnetism particle attracts attention as a new bearer of local hyperthermia. Examination with already detailed the exoergic device and its description of magnetite as a magnetic particle is made. As a warm temperature derivative [ShinkaiM by which ***** is being established, Suzuki M and Iijima S, Kobayashi T and Antibody-conjugated magnetoliposomes for targeting cancer cells and their application in hyperthermia, Biotechnol.Appl.Biochem, 21, 125-137 (1994)]. Therefore, it has started how a success of local hyperthermia can introduce magnetite into a tumor cell efficiently.

[0005] On the other hand, the current human gene therapy many is started considering the U.S. as a core, safety is high and research using the liposome whose introductory effectiveness is also a high lipid capsule as support of a gene is made. For example, it offers that Felgner and others is an efficient and simple means by which cationic liposome carries a nucleic acid and protein to various cells. Moreover, [Felgner PL proving being what has many advantages in in vivo transgenics, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84, and 7413-7414 (1987), Felgner PL, et al., Nature, 337, 387-388 (1989)]. Yagi and others about the transgenics by liposome The rate of embedding to the liposome of a plasmid (it is said for embedding of putting in the matter into liposome that it carries out), As an ingredient which does research from the transgenics to a cell, and the field of manifestation effectiveness, and gives positive charge to liposome N -(alpha-trimethylammonio acetyl)- Didodecyl-D-glutamate chloride (TMAG) is chosen. This and JIRAU roil phosphatidylcholine (DLPC), The cationic liposome prepared combining dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) by the fixed ratio shows incorporation of high DNA. And [Koshizaka T, Hayashi Y, and YagiK, Novel liposomes for efficient transfection of beta-galactosidase gene into COS-1 cells.J.Clin.Biochem.Nutr.7, 185-192 (1989)], Moreover, on [where the method of preparation is simple in the multiplex layer liposome prepared only by shaking], That safety is high Reported [Yagi K and Noda H, Kurono M, and Ohishi N and Effective gene transfer with less cytotoxicity by means of cationic multilamellar liposomes.Biochem.Biophys.Res.Commun 3, 1042-1048 (1993)]. Furthermore, another advantage of cationic liposome is making a specific cell attack liposome by combining a monoclonal antibody and ligand. this invention persons inquire about the targeting (targeting) therapy over HITOGURIOMA using the aforementioned cationic liposome in collaboration with Yagi and others. That 10 - 20% of the cell by which transgenics was carried out discovers this gene after liposome-medium transgenics by in vitro, and by combining the anti-HITOGURIOMA cell monoclonal antibody G-22 with liposome That introductory effectiveness and tumor cell singularity improve Proved [Mizuno M and Yoshida J, Sugita K, and Inoue I, Seo H, Hayashi Y, and Koshizaka T, Yagi K, and Growth inhibition of glioma cells transfected with the human beta-interferon gene by liposomes coupled with a monoclonal antibody.Cancer Res, 50, 7826-7829 (1990)]. Moreover, association to the liposome of these monoclonal antibodies A chemical reaction and others, for example, Leserman, [Leserman et al., Nature, and 288,602-604] (1980) is followed. What was performed by using a cross linking agent and N-hydroxy SUKUSHINIMIJIIRU-3-(2-pyridyl dithio) propionate (SPDP) this invention person prepared immuno liposome excellent in the transgenics and manifestation effectiveness to the rate of embedding, and a tumor cell to liposome by the original approach shaking is only, without performing a chemical reaction in this research.

[0006] [0007] it is just going to expect the installation to the tumor cell of ceramide, an anti-Fas antibody, magnetite, or a gene that the possibility of use of the above immuno liposome is very much based on the above knowledge

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The purpose of this invention is offering the immuno liposome which introduces ceramide or an anti-Fas antibody into a tumor cell alternatively, and can guide apoptosis efficiently, the immuno liposome which introduces magnetite or a gene into a tumor cell alternatively, and has the description as a vector of warm temperature or gene therapy, and those

preparation approaches.

[0008]

[Means for Achieving the Goal] this invention persons proved that these could be introduced into a tumor cell efficiently and alternatively enclosure or by carrying out embedding to the cationic liposome which combined the monoclonal antibody G-22 (anti-CD44 antibody) which reacts alternatively ceramide, an anti-Fas antibody, magnetite, or a gene to a tumor cell, as a result of repeating research that the above-mentioned technical problem should be solved. Furthermore, by front 2 persons, it found out that apoptosis could be efficiently guided to a GURIOMA cell by installation, and this invention was completed.

[0009] That is, this invention explains this invention to the following related with the immuno liposome characterized by enclosure or carrying out embedding at the cationic liposome which combined the monoclonal antibody (anti-CD44 antibody) which reacts alternatively to a tumor cell the antitumor activity matter chosen from the group which consists of ceramide, an anti-Fas antibody, magnetite, and a gene, and its preparation approach concretely.

[0010]

[Embodiment of the Invention]

The liposome film used as the foundation of liposome film this invention consists of monoclonal antibodies (anti-CD44 antibody) which react to the tumor cells (a GURIOMA cell, a melanoma cell, lung cancer cell, etc.) which are carrying out the superfluous manifestation of two kinds of lipids and CD44 of dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDAB) and dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) alternatively. Since stabilization of the configuration of liposome is achieved, choline lipids, such as JIRAU roil phosphatidylcholine (DLPC), may be added. DDAB which is one of the configuration lipids is a lipid which gives positive charge to liposome. The additive to the tumor cell which the electric charge of inside-and-outside both sides of liposome is just carried out, consequently has negative charge, i.e., the introductory effectiveness of the various antitumor activity matter (ceramide, an anti-Fas antibody, magnetite, or gene) said to this invention, improves by using this lipid. Furthermore with the gene, it has led also to enclosure in the case of liposome preparation, or improvement in embedding effectiveness from the very thing having negative charge. Configuration mole ratio of a lipid Being referred to as 2:1 or 1:2 by DDAB and DOPE is illustrated, and a suitable quantity of an additive may be added.

[0011] The device will not be asked, if the antitumor activity matter introduced to a tumor cell in antitumor activity matter this invention introduced into a tumor cell is introduced into a tumor cell and the antitumor effectiveness can be demonstrated. What is specifically alternatively introduced into a tumor cell and can guide apoptosis efficiently, for example, ceramide, (C2 or C6 ceramide analog which can guide the apoptosis of ceramide or others), an anti-Fas antibody or the magnetite that is alternatively introduced into a tumor cell and can demonstrate a warm temperature curative effect, and a gene still more effective in antitumor are said. As a gene effective in antitumor, suitably A suicide gene, the gene which specifically carries out the code of the herpes simplex thymidine kinase, Or in a cytokine gene and a concrete target, it is interferon (IFN). - alpha, beta, gamma, a granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), (Interleukin IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, and IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, tumor necrosis factor (TNF) - alpha, Lymphotoxin (LT) - beta and a granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), A macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and a macrophage migration inhibition factor (MIF), The gene which carries out the code of the various cytokine, such as a leukemia inhibitory factor (LIF), the T cell activation costimulatory factor B7 (CD80) and B7-2 (CD86), kit ligand, and Oncostatin M, is mentioned. Even if the above-mentioned gene used in this invention is cDNA which isolated and was obtained from the cell using the well-known technique, it may be chemically compounded according to approaches, such as PORIME ball-race chain reaction (PCR), from the information disclosed by well-known reference etc., but in order to suppress immunity-rejection to min, and in order to raise a curative effect, its thing of the Homo sapiens origin is desirable.

[0012] G-22 monoclonal antibody (anti-CD44 antibody)

The fact that CD44 which a part of HITOGURIOMA cell, melanoma cell, or lung cancer cell was identified as homing receptor of a lymphocyte by research of this invention persons is superfluously discovered is found out. It is based on this fact. [Wakabayashi T to which production of a specific antibody (anti-CD44 antibody) to a HITOGURIOMA cell was performed, Yoshida J, Seo H, et al., and Characterization of neuroectodermal antigen by a monoclonal antibody and its application in CSF diagnosis of human glioma. J Neurosurg, 68, and 449-455 (1988), Okada H and Yoshida J, Seo H, et al., Anti - O [glioma] surface antigen monoclonal antibody G-22 recognized overexpressed CD44 in gliomacells. Cancer Immunol. Immunother. 39, 313-317 (1994)]. Production can be performed by uniting the splenic cells and myeloma cell of a mouse which were immunized with the antigen discovered on an obligatory means, i.e., this cell, and cultivating the obtained hybridoma. Moreover, a monoclonal antibody may be intact IgG or may be the part, for example, any of F(ab')₂.

[0013] The tumor cell set as the object of the therapy by immuno liposome in tumor cell this invention is a GURIOMA cell, a melanoma cell, or a lung cancer cell etc. which is a CD44 superfluous manifestation cell.

[0014] It can carry out by the approach which added some amelioration to the vibration which is an obligatory means in the case of preparation of multiplex layer liposome as the preparation approach of the immuno liposome of preparation this invention of immuno liposome. The aforementioned lipid thru/or the aforementioned mixed lipid (in the case of ceramide, it mixes together with a liposome lipid after dissolving in chloroform at this time) which specifically dissolved in chloroform is added to a spitz, a solvent is evaporated in a rotary evaporator, and the liposome film is prepared. The phosphate buffer solution which contains an anti-Fas antibody, magnetite, or a gene in this is added, G-22 monoclonal antibody (anti-CD44 antibody) is further added at a rate of 2ng(s) to 2microg to 1micromol, and it shakes for 5 minutes from 1. Per 1micro of lipids mol, as for 2microg from 2ng(s), and magnetite, 5 to 30microg is illustrated, and, as for a monoclonal antibody, 5 to 30microg is illustrated for the mixing ratio of a lipid and other additives (a monoclonal antibody is included), as for a gene.

[0015] The aforementioned lipid thru/or the aforementioned mixed lipid (in the case of ceramide, it mixes together with a liposome lipid after dissolving in chloroform at this time) which dissolved in pharmaceutical preparation-sized chloroform is added to a spitz, a solvent is evaporated in a rotary evaporator, and the liposome film is prepared. According to this approach, vial-ization of the liposome film is measured and sterilization preservation is carried out. In order to prevent oxidation of a lipid, cool place preservation is desirable. On the other hand, the antibody, the magnetite, or the gene which is other additives is made into a different vial, respectively, and is saved. Also in this case, cool place preservation is desirable. It mixes just before use and the vial (depending on the case, they are two kinds) of this additive and the vial of the liposome film are used after shaking.

[0016] As an administration gestalt of the immuno liposome of this invention, partial injection is carried out to anticipation seeding or the transition part corresponding to the neoplasm focus or a neoplasm, and also the whole body administration in the usual vein and an artery etc. is mentioned depending on the case. Although the dose of the immuno liposome of this invention changes with age, sex, a symptom, a route of administration, and counts of administration, it is appropriate for it to convert per adult day and into the amount of lipids, and to consider as the range of 10 to 1000nmol(s).

[0017]

[Example] The following examples explain this invention to a detail further. These examples are the things for explanation and do not limit the range of this invention.

[Example 1] The preparation (1) ceramide and the lipid C2 for liposome of ceramide content immuno liposome - They are MATREYA INC., Pleasant Gap, PA, and USA about ceramide. More; Dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDAB), JIRAU roil phosphatidylcholine (DLPC) -- Sigma Chemical Co., St., Louis, and MO; And They are Avanti Polar Lipids, Birmingham, and AL about dioleoyl phosphatidyl-ethanolamine (DOPE). It purchased and this was used.

[0018] (2) G-22 The specific G-22 monoclonal antibody (mouse IgG monoclonal antibody) was performed to the surface antigen (CD44) of the preparation HITOGURIOMA cell of a monoclonal antibody according to the publication of Wakabayashi, T. et al., J. Neurosurg., 68, and 449-455 (1988).

The spleen cell of the mouse first immunized by HITOGURIOMA cell strain SK-MG -4 was united with mouse myeloma cell strain NS-1 according to Dippold WG, Lloyd KO, Li LYC et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77, and 6114-6118 (1980). Acting as the monitor of the antibody activity in the culture supernatant on the panel of a GURIOMA cell, a neuroblastoma, and the culture cell strain of other tumor cell origins, the hybridoma was chosen and cloning was performed in limiting dilution. The selected hybridoma was inoculated into the BALB/c mouse and the target monoclonal antibody was obtained from ascites.

[0019] (3) Preparation of the preparation liposome of liposome was performed by the brief method which added some amelioration to the vibration which is an obligatory means in the case of preparation of multiplex layer liposome. First, DDAB, DOPE, and C2 - It is ceramide 1:2:2 Or solvent removal was carried out at the bottom of the test tube which carried out dissolution mixing and which was siliconized with chloroform at a rate of 1:2:4 (whole-quantity 2 mumol) using the rotary evaporator. To this lipid film, it is (2). Prepared 2microg Phosphate buffer solution 500 of Dulbecco containing G-22 monoclonal antibody mul It added. The ceramide-immuno liposome made into the purpose was obtained by shaking the test tube containing a lipid film and a phosphate buffer solution for 1 - 5 minutes until mixture becomes clarification.

[0020] (4) Introductory HITOGURIOMA cell to the tumor cell of ceramide It is U-251SP, SK-MG -1, and T98G 10% Fetal calf serum (FCS), streptomycin (100microg/(ml)), penicillin (100U/ml), and 4mM It maintained by Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) which added L-glutamic acid and nonessential amino acid.

[0021] Culture culture-medium suspension of the above-mentioned GURIOMA cell (7.5x10⁴ cells/ml) 2ml Falcon (Falcon) plate (#3046) It scatters to each well and they are 5%CO₂ and 95%. It incubated at 37 degrees C under the wet atmosphere of air for 24 hours. liposome solution 30microl (60nmol lipid) the mole fraction -- 1:2:2 (=DDAB:DOPE:C2-ceramide) it is -- the time -- the last concentration of ceramide -- 12microM it becomes -- as -- or the mole fraction -- 1:2:4 (=DDAB:DOPE:C2-ceramide) it is -- the time -- the last concentration of ceramide -- 24microM It added to the culture culture medium so that it might become. Culture media were exchanged after 16-hour culture at 37 degrees C, and fixed time amount incubation of the cell was carried out at 37 more degrees C. They are DDAB and DLPC about the empty liposome which is controlled, It reaches, DOPE is used and it is the mole fraction, respectively 1:2:2 It prepared.

[0022] [The example 1 of a trial]

(1) Analysis of analysis (approach) DNA fragmentation of DNA fragmentation [Jarvis WD and Kolesnick RN, Fornari FA, and Traylor RS, Gewirtz DA, and Grant S and Induction of apoptotic DNA damage and cell deathby activation of the sphingomyelin pathway, Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 91, 73-77 (1994)] To the approach of a publication, some amelioration Added 2% agarose gel electrophoresis performed. A suspension cell or fixing cells are collected two days after ceramide-immuno liposome (24 muM) processing, and it dissolves in SDS/0.1M NaCl/1mM EDTA, and pH7.5 0.5%, and is Protease K (100microg/(ml)) about the solution. 50 degrees C was processed for 12 hours. It is Protease K 94 degrees C and 5 By carrying out thermal denaturation between parts, inactivation is carried out and it is 1/10 capacity. 3M Sodium acetate and 2.5 The cold ethanol of twice capacity was added in order to settle DNA. A solution is held by -70 ** for 15 minutes, and it is 30,000xg. At-long-intervals alignment separation was carried out for 10 minutes. It is TE20microl about a pellet to the last. It dissolves and is 0.4. Electrophoresis was carried out by 2% agarose gel containing mug/ml of ethidium bromide. The resolving pattern was visualized under UV light.

[0023] (Result) DNA extracted from the cultured cell processed in ceramide-immuno liposome showed the electrophoresis profile of the ladder-type of the oligo nucleosome DNA fragment which is the description of apoptosis (drawing 1).

[0024] (2) The antitumor effectiveness (approach) ceramide-immuno liposome to the cultured cell of ceramide-liposome, Or ceramide liposome prepared similarly [without combining an antibody] [mole fraction 1:2:2 (=DDAB:DOPE:C2-ceramide); [Ceramide last concentration 12microM in a culture medium,] Or mole fraction 1:2:4 (=DDAB:DOPE:C2-ceramide); The growth inhibition effectiveness of

the ceramide introduced into the culture GURIOMA cell was investigated using ceramide last concentration [of 24micro] M] in a culture medium. Into the culture GURIOMA cell, 48 hours after carrying out liposome processing, measurement of the viable count which eliminated trypan blue dyeing under the hemosite meter estimated. As control, processing by empty liposome or ethanol-dissolution ceramide (four in ethanol mM) was performed.

[0025] (Result) In Table 1, the percentage reduction of cytotoxic (%), i.e., the number of survival cells to an unsettled cell, was shown about each liposome mold and a cell strain. depending on the empty liposome of control, remarkable cytotoxicity was not observed at all -- receiving -- ceramide liposome 12microM **** -- all three sorts of cells -- setting -- cytotoxicity -- appearing -- ceramide-immuno liposome 12microM **** -- it turned out that still higher cytotoxicity is shown and effectiveness goes up further by association of an antibody. It compared with the case of ethanol-dissolution liposome. The statistical difference by student-t test ($p < 0.01$) is U-251SP who processed by ceramide-liposome. And it saw in all the cells of SK-MG -1 and ceramide-immuno liposome processing.

[0026] moreover, ceramide liposome 24microM Ceramide liposome 12microM comparing -- high cytotoxicity -- being shown -- the effectiveness -- a dosage -- although it turned out that it is anaclitic, the dose-dependency was similarly seen in ceramide-immuno liposome. Moreover, SK-MG -1 And the statistical difference was looked at by T98G.

[0027]

[Table 1]

----- A cell strain Processing liposome U-251SP SK-MG1 T98G -----
 ----- Empty liposome 2.0**0 5.8**2 8.1**1.2 Ethanol-dissolution ceramide (12microM)
 7.5**1 35.4**2 50.0**2.4 Ceramide liposome (12microM) 34.7**2 * 54.6**1.5 * 60.6**1.4 Ceramide-immuno liposome (12microM) 56.3**2.5 * 63.8**1.5 * 80.3**0.7 * ethanol-dissolution ceramide (24microM) 33.1**1.5 39.2**356.1**2.4 ceramide liposome (24microM) 44.2**2.569.1**0.35* 81.8**0.3 * ceramide-immuno liposome 61.8**2 (24microM) 72.4**1.7 * 86.3**0.6 * -----
 ----- cytotoxicity (%)

* Those with a statistical difference student-t test [$(p < 0.01)$ 0028] [Example 2] The preparation (1) anti-Fas antibody of anti-Fas antibody content immuno liposome and the lipid anti-Fas antibody for liposome were purchased from Medical and biological laboratories (MBL), Co., Ltd., Nagoya, and Japan. The lipid for liposome is like the above.

[0029] (2) G-22 monoclonal antibody (anti-CD44 antibody)

It is like the above.

[0030] (3) Preparation of the preparation anti-Fas antibody content immuno liposome of anti-Fas antibody content immuno liposome was performed by the approach which added some amelioration to the vibration which is an obligatory means in the case of preparation of multiplex layer liposome. Choline lipids, such as JIRAU roil phosphatidylcholine (DLPC), were added in order to achieve stabilization of the configuration of liposome first. That is, the solvent was removed at the bottom of the spitz which carried out dissolution mixing at a rate of 1:2:2 or 1:3:2 at chloroform, and silicon-ized DDAB, DOPE, and a choline lipid by the mole ratio, respectively using the rotary evaporator. It is the lipid total amount mol of 1micro about the anti-Fas antibody which dissolved in this lipid film (liposome film) at the phosphate buffer solution. It receives and is 2ng(s) to 2microg. It adds at a rate and is the lipid total amount mol of 1micro about G-22 monoclonal antibody (anti-CD44 antibody) further. It receives and is 2ng(s) to 2microg. It added at a rate and shook for 5 minutes from 1. Furthermore, the phosphate buffer solution was added after that, and the whole quantity was prepared to 500microl. The anti-Fas antibody content immuno liposome made into the purpose by this approach was obtained.

[0031] [Example 2 of a trial] They are 15 thru/or 30nmol lipid / ml about the antitumor effectiveness (approach) anti-Fas antibody content immuno liposome to the cultured cell of the antitumor effectiveness (1) anti-Fas antibody content immuno liposome to the cultured cell of anti-Fas antibody content immuno liposome. It added into the culture GURIOMA cell at a rate, and the growth inhibition effectiveness of a GURIOMA cell was investigated. Tales-doses addition of the anti-Fas antibody free as an object was carried out.

[0032] (Result) In Table 2, the percentage reduction of cytotoxic (%), i.e., the number of survival cells to an unsettled cell, was shown about each liposome mold and a cell strain. Also in any of an anti-Fas antibody and anti-Fas antibody content immuno liposome, cytotoxicity was observed in all culture cell strains. The way of anti-Fas antibody content immuno liposome had a significant difference statistically, and the cytotoxicity had it. [stronger than the case where a free anti-Fas antibody is added] Moreover, as for the cytotoxic gestalt, it was proved by the TUNEL assay that it is apoptosis.

[0033]

[Table 2]

----- A cell strain U-251 SP SK-MG -1 T98G -----
 Liposome of sky 1.2 ** 0.3 4.2**1.8 5.0**1.1 Pit Fas antibody 0.1 mug 4.3**0.7 2.5**0.4 3.2**1.5 1.0 mug 8.4**2.5 10.1**2.1 12.7**3.0 100 mug 56.7**4.460.3**3.8 58.9**5.5 Liposome The amount of antibodies 0.1 mug 52.2**3.8 48.3**5.450.1**6.3 1.0 mug 78.4**4.5 67.5**4.767.4**3.8 The amount of immuno liposome antibodies 0.1 mug 69.3**4.1 64.5**3.4 66.6**4.21.0 mug 88.7**6.3 80.5**7.1 85.3**3.9 -----

[0034] The preparation (1) magnetite of [example 3] magnetite content immuno liposome and the lipid magnetite for liposome were prepared according to the approach of Sinkai M, Honda H, Kabayashi T, Preparation of fine magnetic particles and application for enzyme immobilization Biocatalysis, 5, and 61-69 (1991).

[0035] The lipid for liposome is like the above.

[0036] (2) G-22 monoclonal antibody (anti-CD44 antibody)

It is like the above.

[0037] (3) Preparation of the preparation magnetite content immuno liposome of magnetite content immuno liposome was performed by the approach which added some amelioration to the vibration which is an obligatory means in the case of preparation of multiplex layer liposome. Choline lipids, such as JIRAU roil phosphatidylcholine (DLPC), were added in order to achieve stabilization of a configuration first. The solvent was removed at the bottom of the spit which carried out dissolution mixing at a rate of 1:2:2 at chloroform, and silicon-ized DDAB, DOPE, and a choline lipid by the mole ratio, respectively using the rotary evaporator. It is 20microg to the lipid total amount mol of 1micro about the magnetite dissolved in this lipid film (liposome film) at the phosphate buffer solution. It adds at a rate and is [as opposed to / further / the lipid total amount mol of 1micro] 2ng(s) to 2microg about G-22 monoclonal antibody (anti-CD44 antibody). It added at a rate and shook for 5 minutes from 1. Furthermore, a phosphate buffer solution is added after that, and it is 500microl about the whole quantity. It prepared. The magnetite content immuno liposome made into the purpose by this approach was obtained.

[0038] They are 15 thru/or 30nmol lipid / ml about the incorporation (approach) magnetite content immuno liposome of the incorporation (1) magnetite of the iron of the cultured cell by [example 3 of trial] magnetite content immuno liposome. It added into the culture GURIOMA cell at a rate, and the amount of incorporation of the magnetite of a GURIOMA cell was investigated. Tales-doses addition of the magnetite free as an object was carried out. The cell was removed by concentrated hydrochloric acid, it removed the cell melt in TCA after the dissolution, and the amount of incorporation of intracellular magnetite added StCl, measured the concentration of magnetite in atomic absorption analysis, and computed the amount of magnetite.

[0039] (Result) In Table 3, the amount of the magnetite incorporated by the culture GURIOMA cell was shown about each liposome mold. When the free magnetite of tales doses was added into a culture GURIOMA cell, most incorporation of intracellular magnetite was not observed. On the other hand, incorporation of a lot of magnetite was observed in magnetite content immuno liposome. The amount of incorporation was 10 or more times of the liposome prepared by lipid called phosphatidylcholine, conventional phosphatidylserine, or conventional cholesterol. Moreover, the iron amount of incorporation increased more nearly intentionally than the usual liposome which has not combined anti-CD44 antibody by the immuno liposome which combined anti-CD44 antibody.

[0040]

[Table 3]

----- A cell strain U-251 SP SK-MG -1 T98G ----- liposome 17.0
 18.0 19.0 Immuno liposome 42.0 36.0 As for a 37.0 ----- numeric value, magnetite
 content liposome or even a cell in 16 hours after immuno liposome administration shows the amount of
 incorporation of neighboring magnetite (3O4/cell of pg-Fe).

[0041] [Example 4] The preparation (1) gene of gene content immuno liposome and the lipid gene for
 liposome used eukaryotic cell expression vectors, such as pCH110 (it purchases from Pharmacia), and
 pSV2 IFN-beta (a grant is made from Toray Industries, Inc.). The lipid for liposome is like the above.

[0042] (2) G-22 monoclonal antibody (anti-CD44 antibody)

It is like the above.

[0043] (3) Preparation of gene content immuno liposome preparation gene content immuno liposome
 was performed by the approach which added some amelioration to the vibration which is an obligatory
 means in the case of preparation of multiplex layer liposome. Choline lipids, such as JIRAU roil
 phosphatidylcholine (DLPC), were added in order to achieve stabilization of a configuration first. The
 solvent was removed at the bottom of the spitz which carried out dissolution mixing at a rate of 1:2:2 at
 chloroform, and silicon-ized DDAB, DOPE, and a choline lipid by the mole ratio, respectively using the
 rotary evaporator. It is the lipid total amount mol of 1micro about the gene which dissolved in this lipid
 film (liposome film) at the phosphate buffer solution. It receives and is 20microg. It adds at a rate and is
 the lipid total amount mol of 1micro about G-22 monoclonal antibody (anti-CD44 antibody) further. It
 receives and is 2ng(s) to 2microg. It added at a rate and shook for 5 minutes from 1. Furthermore, a
 phosphate buffer solution is added after that, and it is 500microl about the whole quantity. It prepared.
 The gene content immuno liposome made into the purpose by this approach was obtained.

[0044] [Example 4 of a trial] The gene expression (1) gene-expression (approach) gene content immuno
 liposome in the cultured cell by gene content immuno liposome was added into the culture GURIOMA
 cell at 15 thru/or 30nmol lipid / a rate of ml, and the introductory gene expression in a GURIOMA cell
 was investigated. Tales-doses addition of the gene free as an object was carried out.

[0045] (Result) In Table 4, the gene expression introduced into the culture GURIOMA cell was shown
 about each liposome mold. When the free gene of tales doses was added into a culture GURIOMA cell,
 the manifestation was not observed at all. On the other hand by gene content immuno liposome, the
 manifestation was observed. Moreover, introductory gene expression increased more nearly
 intentionally than the usual liposome which has not combined anti-CD44 antibody by the immuno
 liposome which combined anti-CD44 antibody.

[0046]

[Table 4]

----- A cell strain U-251 SP SK-MG -1 T98G -----
 The liposome of sky 2.5 > 2.5 > 2.5 > A free gene 2.5 > 2.5 > 2.5 > Liposome 7.5 nmol 23.8 ** 4.0 30.7
 ** 4.8 39.8 ** 8.8 15.0 nmol 52.0** 7.8 60.8 ** 5.6 77.8**12.7 30.0 nmol 126.3**12.1 112.1**10.7
 168.3**17.5 Immuno liposome 7.5 nmol 85.0 ** 7.6 88.9 ** 8.5 63.3 ** 9.7 15.0 nmol 175.8**10.8
 170.5**11.6 140.8**15.3 30.0 nmol 256.3**15.7 240.4**14.7 A 263.3**19.5 -----

---- -- numeric value is the beta interferon concentration (IU/ml) in the culture medium on the 4th after
 transgenics.

[0047]

[Effect of the Invention] Since according to the ceramide content immuno liposome of this invention, or
 anti-Fas antibody content immuno liposome ceramide or an anti-Fas antibody is introduced into a tumor
 cell efficiently and alternatively and apoptosis can be guided, it is effective for the therapy to a malignant
 tumor. Moreover, it is thought that these are useful to the elucidation of the device of apoptosis.

[0048] Since magnetite can be far introduced into a tumor cell efficiently from the magnetite added free
 according to the magnetite content immuno liposome of this invention, it is effective for the partial
 warm temperature therapy to a malignant tumor. Since according to the gene content immuno liposome
 of this invention a gene can be efficiently introduced into a tumor cell and it can be discovered, it is
 effective for the gene therapy to a malignant tumor.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] The AGARORUGERU electrophoresis photograph of DNA extracted from the GURIOMA cell by ceramide-immuno liposome processing is shown.

Lane 1: Molecular weight marker

Lane 2: Extract DNA

[Translation done.]

* NOTICES *

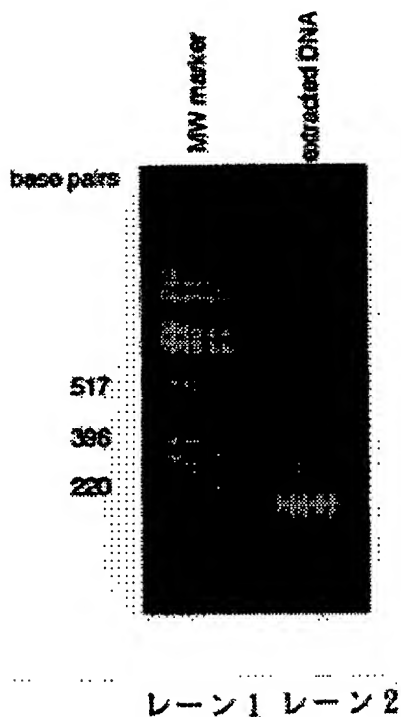
JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

[Drawing 1]

図面代用写真



[Translation done.]